*BAHÇE 51 (Özel Sayı 1): 146–149 (2022)*
*ISSN: 1300-8943 e-ISSN: 2791-6375*

# BİBER ÇEŞİTLERİNDE DOMATES LEKELİ SOLGUNLUK VİRÜSÜ'NE KARŞI DAYANIKLILIK GENİNİN MOLEKÜLER OLARAK BELİRLENMESİ VE KLASİK TESTLEMELER İLE KARŞILAŞTIRILMASI

**Hande Nur ALBEZİRGAN[1]*, Mesut NAR[2], Hakan FİDAN[3]**

*[1]Ziraat Yük. Müh., AG Tohum Sanayi Ticaret A.Ş., Antalya; ORCID: 0000-0002-1089-9529*
*[2]Ziraat Mühendisi, AG Tohum Sanayi Ticaret A.Ş., Antalya; ORCID: 0000-0001-8356-9478*
*[3]Doç. Dr., Akdeniz Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Bitki Koruma Bölümü, Antalya; ORCID: 0000-0002-0384-9486*

## ÖZ

Biber (*Capsicum annuum* L.) sofralarımızda günlük taze tüketimden gıda endüstrisine kadar geniş bir tüketime sahipken ayrıca kapsaisinoid içeriğinden dolayı alternatif tedavi yöntemleri, tropikal kremler, aerosol spreyler ve savunma silahları gibi çok farklı alanlarda kullanılabilmektedir. Önemli ihracat kalemlerimizden biri olan biberin yetiştiricilik alanlarında yaygın olarak Domates lekeli solgunluk virüsü (TSWV)'ne rastlanmaktadır. *C.chinense* türüne ait Tsw geni, biberlerde TSWV'ye karşı dayanıklılığı kontrol etmektedir ve bu gen günümüzde ıslah metotları ile kültür çeşitlerine aktarılmaktadır. Tsw geni içeren biberler TSWV simptomu göstermezken İspanya'da 2004, Türkiye'de ise Samsun'da 2014, Antalya'da 2016 yıllarında dayanıklı biber çeşitlerinde simptomların geliştiği gözlemlenmiş ve rapor edilmiştir. Bu çalışmada, firmamızın gen kaynaklarında bulunan yerel çeşitler; Hatay, Urfa, Antep, Elazığ ve Maraş biber hatları kullanılmıştır. Bu biber hatları Tsw geninin varlığı belirlenmek üzere moleküler olarak testlenmiştir. Gen taraması yapılan biberlere, Antalya ilçelerinden Kaş, Demre, Kumluca, Aksu, Serik ve Gazipaşa'da toplanan TSWV izolatları bulaştırılarak moleküler ve klasik testleme arasındaki doğruluk karşılaştırılacaktır. Moleküler olarak Tsw genine spesifik SCAC568 primeri kullanılarak PCR'da çoğaltılmış, ardından XBAI ve TaqI enzimleri ile kesilmiştir. Sonuçlar 70 adet bitkiden 2 tanesi homozigot ve 43 tanesi heterozigot dayanıklı bulunurken 25 tanesi ise hassas bulunmuştur. Farklı 6 bölgeden toplanan izolatların bulaştırılmasından 8 gün sonra, moleküler olarak dayanıklı tespit edilen biberlerde simptom oluşmaya başladığı gözlemlenmiştir. Bu biberler TSWV hastalık primerleri ile testlendiğinde sonuç pozitif çıkmıştır. Antalya'da yetiştiricilik yapılan bölgelerde yaygın olarak dayanıklılığın üstesinden gelen TSWV 1 izolatı olduğu belirlenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** MAS, PCR, tespit, virüs

## MOLECULAR DETERMINATION OF THE TOMATO SPOT WILD VIRUS RESISTANCE GENE IN PEPPER VARIETIES AND COMPARISON WITH CLASSIC TESTS

## ABSTRACT

Pepper (*Capsicum annuum* L.) has a wide consumption on our tables, from daily fresh consumption to the food industry, it can also be used in many different areas such as alternative treatment methods, tropical creams, aerosol sprays and defense weapons due to its capsaicinoid content. Tomato spotted wilt virus (TSWV) is commonly encountered in the cultivation areas of pepper, which is one of our important export items. The Tsw gene of the *C.chinense* species controls resistance to TSWV in peppers and this gene is now transferred to cultivars by breeding methods. While peppers containing the Tsw gene did not show TSWV symptoms, symptoms were observed and reported in resistant pepper varieties in Spain in 2004, in 2014 in Samsun, and in 2016 in Antalya. In this study, local varieties found in the gene resources of our company; Hatay, Urfa, Antep, Elazig and Maraş pepper lines were used. These pepper lines were molecularly tested for the presence of the Tsw gene. The accuracy between molecular and classical testing will be compared by infecting the peppers with gene screening with TSWV isolates collected in Kaş, Demre, Kumluca, Aksu, Serik and Gazipaşa, districts of Antalya. It was amplified by PCR using molecularly Tsw gene-specific primer SCAC568, then digested with XBAI and TaqI enzymes. Results while 2 of 70 plants were found to be homozygous and 43 of them heterozygous resistant, 25 of them were found susceptible. It was observed that 8 days after the contamination of the isolates collected from 6 different regions, symptoms began to occur in peppers that were found to be molecularly resistant. The result was positive when these peppers were tested with the TSWV disease primers. It was determined that there is TSWV 1 isolate that overcomes the resistance commonly in the regions where agriculture is made in Antalya.

**Keywords:** MAS, PCR, identification, virus

*Sorumlu yazar / *Corresponding author*:

## GİRİŞ

Biber (*Capsicum annuum* L.) üretimi ve tüketimi bakımından ülkemizde ve dünyada önemli ekonomik öneme sahiptir. Üretim miktarına göre FAO verileri sırasıyla Çin, Meksika ve Türkiye'dir [5]. TÜİK bitkisel üretim istatistiklerine göre ülkemizde 2020 yılı içerisinde biber üretimi 2.636.905 milyon tondur [11]. Ülkemizde iller arasında Antalya'nın bitkisel üretim değeri 16 milyon TL olup ilk sırada yer almaktadır. Türkiye genelinde örtü altı üretimin %39'u Antalya'da gerçekleşmektedir. Toplamda 312.226 dekar örtü altı alanda üretim yapılmaktadır. Örtü altı biber üretimi ise ülkemiz genelinde 2.636.905 ton olup 533.435 tonu Antalya'da üretilmektedir. Bu rakamlara göre Antalya biber üretiminin %68'ini oluşturmaktadır.

Fakat biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda hem kaliteyi hem de üretim miktarını etkileyen en önemli faktörlerin başında virüs hastalıkları gelmekte olduğunu belirtmiştir [1]. Virüs hastalıklarına karşı başarılı kimyasal bir mücadele yöntemi bulunmaz. Bu sebeple üretimde dayanıklı bitki tercih edilmeli ve bu virüsleri taşıyan vektörlere karşı önlemler alınmalıdır. Domates Lekeli Solgunluk Virüsü (TSWV), *Frankliniella occidentalis* vektörü ile üretim alanında hızla yayılabilen bir Tospovirus olduğunu bildirilmiştir [2]. Domates, biber, marul, tütün gibi 900'den fazla bitki türünde hastalık oluştururken, yabancı otlar ve süs bitkileri virüs kaynağı olduğunu bildirilmiştir [7].

Gelişmekte olan biyolojik ve biyoteknolojik çalışmalar tarım alanında da aktif olarak kullanılmaktadır. Bitki DNA'ları moleküler genetik analizler sonucu elde edilebilir ve tıpkı insanlarda olduğu gibi kimlikleri belirlenebilir, genetik haritaları çıkarılabilir. Özellikle bitki ıslah çalışmalarında markır destekli seleksiyon (MAS) ile hastalıklara karşı dayanıklı genlerin bitkide var olup olmadığı tespit edilebilir. Biberde TSWV'ye karşı geliştirilmiş Tsw alleleri ile ilişkili moleküler markırlar kullanılmaktadır. TSWV'ye dayanıklılık geni ile ilişkili olan SCAC568 CAPS markırı ıslah programlarında dayanıklı ve hassas biber genotiplerini ko-dominant seviyede (RR, Rr, rr) ayırt etmek için İkten [8] çalışmalarında kullanılmıştır [2].

Günümüzde dayanıklılığı sağlamaya devam eden (RI) izolatının zaman içinde mutasyonlara uğraması ile zamanla dayanıklılığı kıran (RB) izolatı meydana geldiğini belirtmiştir [3]. İspanya'da biber üretimi yapılan alanlarda Tsw geni içeren biberlerde dayanıklılığı kıran TSWV izolatının ilk raporu Margaria ve ark. [10] tarafından yayınlanmıştır [8]. Ülkemizde ilk kez Samsun'da Deligöz [4] biber yetiştirilen alanlarda rapor edilirken Antalya'da Fidan [6] dayanıklılığı kıran izolat rapor edilmiştir [4, 6].

## MATERYAL VE METOT

### *Antalya Biber Üretimi Yapılan Alanlardan TSWV'li Örneklerin Toplanması*

Kaş, Demre, Kumluca, Aksu, Serik ve Gazipaşa'da biber yetiştiriciliği yapılan alanlarda TSWV simptomlu yaprak ve meyve örnekleri toplanarak AG Tohum laboratuvarlarına getirilmiştir. Her ilçenin 4 farklı biber serasından alınan toplam 24 adet örnek laboratuvara getirilmiştir. TSWV'nin eski ve yeni ırklarına ve önemli biber virüs hastalıklarına karşı moleküler markırlar ile testlenmiştir.



Şekil 1. TSWV simptomlu örneklerin toplanması

### *Biber Hatlarında Tsw Geninin Moleküler Olarak Belirlenmesi*

Firmamızın gen kaynaklarında bulunan yerel çeşitler; Hatay, Urfa, Antep, Elazığ ve Maraş biber hatları kullanılmıştır. Bu biber hatları Tsw geninin varlığı belirlenmek üzere moleküler olarak testlenmiştir.

5 farklı biber hattından henüz fide döneminde kotiledon yapraktan sonra çıkan ilk gerçek yapraklardan örnekler alınmıştır. Total nükleik asit izolasyonu CTAB protokolüne göre yapılmıştır. TSWV'ye dayanıklılığı kontrol eden TSW genine özgü SCAC568 primeri (Forward 1 ul ve Reverse 1 ul) ve 8 ul EcoTaq 2X PCR Master mix ve 8 ul dd$H_2O$ şeklinde hazırlanmıştır. PCR protokolü; ön denatürasyon 98°C'de 1 dakika olarak başlatılmış 94°C'de 30 saniye, 57°C'de 30 saniye, 72°C'de 30 saniye ve 36 döngü, son uzama 72°C'de 3 dakika olarak ayarlanmıştır. Çizelge 1'de primer dizilimi detaylı olarak verilmiştir.

PCR ürünleri elektroforez jel'de yürütülerek UV ışık altında görüntülenmiştir. 568 bp'da bant veren PCR ürünlerinden 10 ul yeni tüplere aktarılmıştır. Örnek başına dd$H_2O$ 17 ul, buffer 2 ul, FastDigest XBAI enzimi 1 ul mix hazırlanarak 37°C'de 5 dakika, 65°C'de 3 dakika protokolünde kesime bırakılmıştır. Kesim ürünleri tekrar elektroforez jel'de yürütülerek UV görüntülenerek bitkilerin dayanıklılık durumları belirlenmiştir.

Çizelge 1. Primer dizilimi, boyut ve bağlanma sıcaklığı

| Markır | | Dizilim | Boyut (bp) | Bağlanma Sıcaklığı |
|---|---|---|---|---|
| SCAC 568 | Forward | 5'GTGCCAGAGGAG GATTTAT3' | 568 | 57 |
| | Reverse | 5'GCGAGGTGGACA CTGATACT3' | | |

### *Klasik Testlemeler*

Moleküler olarak dayanıklılık durumları belirlenen Hatay, Urfa, Antep, Elazığ ve Maraş biberleri klasik testleme için Akdeniz Üniversitesi Ziraat Fakültesi Bitki Koruma Bölümü Viroloji Deneme Seralarına götürülmüştür.

Antalya ilçelerinden toplanan ve testleme sonucu TSWV pozitif çıkan biber örnekleri paçal yapılarak 0.02 M Fosfat tampon (pH:7) çözeltisi + %0.1'lik 2-mercaptoethenol ile ezilmiştir. Dayanıklılık durumları moleküler olarak belirlenmiş biber bitkilerine soft-sponge pad yöntemi ile bulaştırılmış, ardından simptomatolojik olarak gözlemler yapılmıştır.

## BULGULAR VE TARTIŞMA

### *Antalya Biber Üretimi Yapılan Alanlardan TSWV'li Örneklerin Testlenmesi*

Antalya ilçelerinden toplanan 24 adet örnek TSWV'ye karşı testlenmiştir. Toplanan örneklerin tamamı TSWV açısından pozitif bulunurken, biberdeki diğer önemli virüs hastalıkları açısından temiz bulunmuştur.

### *Biber Hatlarında Tsw Geninin Moleküler Olarak Belirlenmesi*

Fide döneminden örnek alınarak TSWV'ye dayanıklılık bakımından moleküler olarak testlenen 70 adet bitkiden 2 tanesi homozigot ve 43 tanesi heterozigot dayanıklı bulunurken 25 tanesi ise hassas bulunmuştur.

### *Klasik Testlemeler*

Farklı 6 bölgeden alınan izolatlar dayanıklı bulunan biber hatlarına ayrı ayrı bulaştırılarak bir kombinasyon oluşturulmuştur. Ayrıca farklı izolatlar hassas bitkilere de mekanik olarak bulaştırılarak kontrol olarak kullanılmıştır. Bulaştırmadan 15 gün sonra moleküler olarak homozigot ve heterozigot belirlenen dayanıklı bitkilerde TSWV simptomları gözlemlenmiştir. TSWV'ye spesifik primerle ile testlendiğinde sonuçlar pozitif bulunmuştur.




Şekil 2. SCAC568 primeri ve XBAI kesim enzimi ile Tsw geninin moleküler olarak belirlenmesi S; Hassas, H; Homozigot dayanıklı, Ht; Heterozigot dayanıklı

## SONUÇ

Dayanıklı olarak belirlenen biber bitkilerinde simptom görülmesi beklenmezken, hassas bitkilerde simptom görülmesi beklenen bir durumdur. Fakat yapılan çalışmada moleküler olarak dayanıklı belirlenen biber hatlarında simptomlar oluştuğu gözlemlenmiştir. Dayanıklılığın kırıldığı daha önceki yapılan çalışmalarda belirlenmiş olup dayanıklılığı kıran izolatın Antalya bölgesinde biber üretimi yapılan alanlarda yaygın olduğu sonucuna ulaşılmıştır.

Domates üretimi yapılan alanlarda da problem olan TSWV, İspanya'da üretim alanlarında dayanıklılık kıran izolatın düşük oranda gözlemlendiği bildirilmiştir [9]. Antalya ilinde 2016'da tespit edilen dayanıklılığı kıran izolatın ise şu anda biber üretiminin yoğun olarak yapıldığı Kaş, Demre, Kumluca, Aksu, Serik ve Gazipaşa ilçelerinde hakim izolat olduğu belirlenmiştir.

TSWV'ye karşı dayanıklılığın kırılması ile birlikte doğal dayanıklılık kaynaklarının araştırılması ve dayanıklılık gen/genlerinin belirlenmesi ile ilgili çok sayıda çalışma yapılmıştır. Fakat dünyada ve ülkemizde ticari olarak bulunan çeşitlerde dayanıklılığı kıran izolata karşı dayanıklılık sağlayan bir çeşit bulunmamaktadır.

Virüs hastalıkları ile mücadelede etkili bir kimyasalın bulunmayışı ve TSWV'ye karşı dayanıklı bir çeşidin henüz olmayışı kültürel önlemleri ön plana çıkarmaktadır. TSWV'nin aktif ve hızlı yayılmasını sağlayan *Frankliniella occidentalis* vektörü kontrol altında tutmak alınabilecek en önemli tedbirlerden biridir.

Moleküler olarak homozigot ve heterezigot dayanıklı belirlenen çeşitlere TSWV mekanik olarak

bulaştırıldığında dayanıklılık durumu fark etmeksizin bitkilerin tümünde hastalık oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu durum yeni dayanıklılık kaynaklarının araştırılmasının gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Dayanıklılığı kıran izolatların Ekim-Şubat ayları arasında bilinen TSWV'ye özgü simptom göstermekte olup sıcaklığın yüksek olduğu Nisan-Mayıs aylarında dayanıklılığı kıran izolatın arazide karşılaşıldığı agresif simptomlar gözlenirken ayrıca simptomların gözlemlendiği en yoğun dönem olduğu belirlenmiştir. Erken güz sezonunda Ağustos ayında dikilen biberlerde yine benzer agresif simptomlar gözlemlenmiştir.

Arazide farklı bölgelerden alınan örnekler incelendiğinde sıcaklıkların artması ile birlikte simptomların şiddetlendiği spesifik simptomlarından uzaklaşarak mozaik simptomlara döndüğü, Hıyar Mozaik Virüsü (CMV) ve Patates Y Virüsü (PVY) gibi virüslerin simptomlarına benzediği gözlemlenmiştir. Simptomlar Tsw geni içeren ve içermeyen çeşitlerde farklılık göstermemektedir. Bu da daha önce dayanıklılığın kırılması ile ilgili yapılan vaka bildirimleri ile örtüşmektedir. Elimizde yerel farklı genotiplerde Tsw geni içeren hatlar kullanılmış olup farklı genetik kökene sahip bireylerin dayanıklılık kıran izolatlara karşı TSWV reaksiyonunun aynı olduğu gözlemlenmiştir.

## TEŞEKKÜR

Bu çalışma AG Tohum Sanayi Ticaret A.Ş. imkânlarıyla yapılmıştır. Desteklerinden dolayı Prof. Dr. Şebnem Ellialtıoğlu, Prof. Dr. Hakan Aktaş, Doç. Dr. Hakan Fidan'a ve Sn. Burak Gönen'e teşekkürlerimizi sunarız.

## KAYNAKLAR

1. Anandakumar, L., Bagyalakshmi, K., Nithya, K., Parameswari, B., Viswanathan, R. 2018. Reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for rapid diagnosis of Sugarcane yellow leaf virus in sugarcane. Sugar Tech, 20(6):708-716.
2. Dal Bo, E., Chiarrone, G., Rolleri, J., Ronco, L. 1999. Tospovirus en los cultivos ornamentales de La Plata. Revista de la Facultad de Agronomía, 104(1):35-40.
3. De Ronde, D., Butterbach, P., Lohuis, D., Hedil, M., Van Lent, J.W., Kormelink, R. 2013. Tsw genine dayalı direnç, domates lekeli solgunluk virüsünün fonksiyonel bir RNA susturucu baskılayıcı proteini tarafından tetiklenir. Moleküler Bitki Patolojisi, 14(4):405-415.
4. Deligöz, I., Sökmen, M.A., Sarı, S. 2014. Domates lekeli solgunluk virüsünün (Tospovirus; Bunyaviridae) Türkiye'deki dayanıklı tatlı biber çeşitlerinde direnç kıran suşuna ilişkin ilk rapor. Yeni Hastalık Raporları 30:26.
5. FAO, 2018. Food and Agriculture Organization of the United Nations (http://www.fao.org; Erişim: 30.09.2022)
6. Fidan, H. 2016. Antalya'da örtü altı domates ve biber alanlarında dayanıklılık kıran Tomato Spotted Wilt Virus (TSWV) izolatların genetik kıyaslanması. 6. Türkiye Bitki Koruma Kongresi, s:560-560.
7. Gordillo, L.F., Stevens, M.R., Millard, M.A., Geary, B. 2008. Screening two *Lycopersicon peruvianum* collections for resistance to Tomato spotted wilt virus. Plant Disease, 92(5):694-704.
8. İkten, H. 2019. Farklı genetik kaynaklardan elde edilen $F_2$ biber genotiplerinde (*Capsicum annuum* L.) TSWV'ye dayanıklılığın moleküler analizi. Mediterranean Agricultural Sciences 32(1):43-48.
9. Lopez, C., Aramburu, J., Galipienso, L., Soler, S., Nuez, F., Rubio, L. 2011. Domates benekli solgunluk virüsünün domates Sw-5 direncini kıran izolatlarının evrimsel analizi. Genel Viroloji Dergisi 92:210-215.
10. Margaria, P., Ciuffo, M., Turina, M. 2004. Almeria, İspanya'daki dirençli biber çeşitlerinde Domates lekeli solgunluk virüsünün (Tospovirus; Bunyaviridae) direnç kırma suşu. Bitki Patolojisi 53(6):795.
11. TÜİK, 2021. Türkiye İstatistik Kurumu (http:// www.tuik.gov.tr; Erişim:30.09.2022)